

Павлов К. И.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Титов Л. П.

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь*

Бутько Л. В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

ИЗМЕРЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ У МЫШЕЙ ЛИНИИ СВ57BL/6В НОРМЕ: ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фермент цитидиндезаминаза (EC number 3.5.4.5; KEGG Link 00983) [7] ответственен за трансформацию дезоксицитидина нуклеиновых кислот в уридин посредством отщепления $-NH_2$ группы в цинксодержащем каталитическом центре. При этом бывший комплиментарным дезоксицитидину во второй цепи дезоксигуанидин меняется на аденозин или тимидин ферментами рестриктазами [5]. Данный процесс является одним из ключевых механизмов пиримидинового метаболизма (KEGG Link 00240), а сам фермент помимо биodeградации нуклеозидов выступает основным внутриклеточным мутагеном и одним из триггеров процессов репарации ДНК и деметилирования [4]. Цитидиндезаминаза содержится в В-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах, нейронах, ткани печени и почек, а также клетках плаценты. В В-лимфоцитах цитидиндезаминаза ответственна за образование соматических гипермутаций (потенциально, основная биологическая роль) и переключение класса синтеза генов иммуноглобулинов. Соматические гипермутации происходят в «горячих точках» переменных участков генов тяжелых цепей иммуноглобулинов. В результате последовательно возрастает аффинность специфичных антител к антигенам [1, 6]. Спектр субстратов довольно широк и включает как мотивы ДНК-последовательности, так и минорные нуклеозиды. «Оборот» фермента зависит от фосфорилирования по серину в 38-м положении. Дефекты в системе соматических гипермутаций могут вызвать снижение гуморального иммунного ответа, гиперактивность же, напротив, чревата повреждением ДНК и онкогенезом.

Одним из основных методов измерения активности сывороточных нуклеозидаз по-прежнему является индофенольная колориметрическая реакция, где в качестве субстрата используются растворы нуклеозидов [2, 3]. При добавлении образца (плазма, лизат клеток) реакция катализируется цитидиндезаминазой и смещена в сторону образования аммиака. После инкубации реакцию прерывают путем добавления фенольно-нитро-пруссидного раствора. Аммиак в присутствии гипохлорита натрия и фенола при катализе нитропруссидом натрия образует индофенол, имеющий интенсивно синюю окраску, изменяя оптическую плотность раствора [2].

Мыши C57BL/6 — одна из наиболее часто используемых инбредных линий мышей в иммунологических экспериментах, исследовании диабета второго типа, атеросклеротической сердечно-сосудистой патологии, фармакокинетики и фармакодинамики опиатов, исследовании сенсорной патологии и индуцированного мутагенеза. C57BL/6 — это долгоживущие, крупные мыши с низким процентом появления опухолей в последующих поколениях.

Цель исследования: получить базальное значение внутриклеточной активности цитидиндезаминазы у мышей C57BL/6 для последующего исследования поствакцинального иммунного ответа.

Материалы и методы. Мыши линии C57BL/6 и СВА, n = 10. Соотношение самцов и самок: 50/50. Масса — 30–35 грамм. Средний возраст — 9 месяцев. Эвталия: ингаляция углекислого газа (в соответствии с рекомендациями Американской Ассоциации ветеринаров). Забор крови: кардиальная пункция на бьющемся сердце с предварительным вскрытием грудной клетки. Забор селезенки: орган помещался в культуральную среду DPMEM при температуре 37 °С.

Селезёнка разрезалась на 5–6 фрагментов хирургическими ножницами, далее паренхима вылущивалась инъекционными иглами и глазным пинцетом.

Клетки подсчитывались в счетной камере с сеткой Горяева и далее разводились средой до 10–12 млн клеток в миллилитре среды. Один миллилитр среды добавляли в Эппендорф 1,5 мл. Дезинтеграция клеток проводилась стандартным методом трехкратного замораживания-оттаивания (–25 °С – 37 °С). Морфологически спленоциты изучались с помощью окраски по Романовскому–Гимзе.

Проточная цитометрия. Контроль получаемой клеточной суспензии производился на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Исследовались параметры прямого и обратного светорассеяния. Жизнеспособность клеток оценивалась по инкорпорации пропидия йодида.

Определение ферментативной активности. В качестве базовой методики была использована колориметрическая индофенольная реакция по инструкции «Способ диагностики плеврита туберкулёзной этиологии на основании определения активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови и в плевральной жидкости» (Разработчики: А. Д. Таганович, Г. Л. Гуревич, С. М. Алинежад, Ф. И. Захаревский, 2008) [3] со следующими принципиальными дополнениями:

1. Реакция проводилась в плоскодонном 96-луночном планшете со следующим соотношением реакционных компонентов 60 мкл субстрата: 30 мкл исследуемой жидкости: 90 мкл фенольно-нитропруссидного раствора: 90 мкл основного раствора гипохлорита натрия.

2. Содержание катализатора нитропрусида в 4 раза выше, чем в инструкции.

3. Концентрация субстратных растворов была снижена в два раза, до 10,5 ммоль/л.

4. Срок инкубации — 4 часа.

5. Измерение проводилось на Иммуноферментном анализаторе BiotekEb 800 при длине волны 630 нм.

Реагенты. Цитидин, цитозин, гуанозин, аденозин (любезно предоставлены проф. А. И. Зинченко и С. В. Квачом). Фосфатный буфер (50 ммоль/л; pH 6,5). 5,35

г $\text{NaN}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 5,62 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде и довести полученный раствор дистиллированной водой до объема 1000 мл. Цитидин, цитозин, гуанозин, аденозин — 10,5 мМоль/л (56 мг субстрата на 20 мл буфера). Фенол — 10 г/л (106 мМоль/л). Нитропруссид — 200 мг/л. Гипохлорид (Sigma-Aldrich) — 16,4 мл 5 % раствора до 1 литра (11 ммоль/л).

Расчетная методика. Для расчета активности фермента использована формула G. Giusti, B. Galanti, 1984; R. Pedersen, A. Berry, 1977 [3].

Статистическое исследование. Обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 10 for Windows и Microsoft Excel. Для характеристики значения активности цитидиндезаминазы использованы методы описательной статистики. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Полученная клеточная суспензия по морфологическим критериям и параметрам светорассеяния характеризовалась относительной однородностью. Тем не менее, отмечено значительное содержание крупных клеток, морфологически эквивалентных лимфоцитам (рис. 1).

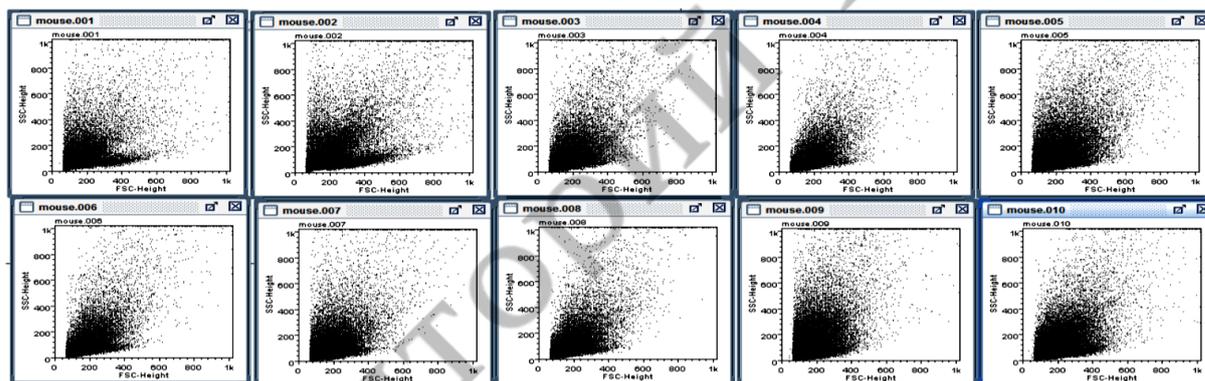


Рис. 1. Цитограммы прямого и обратного светорассеяния спленоцитов мыши сразу после выделения

Центрифугирование на градиенте Урографин-Фикол с плотностью 1090–1096 г/л позволяет добиться увеличения однородности популяции клеток за счет удаления крупных, высокозернистых морфологических единиц и повышения жизнеспособности (рис. 2).

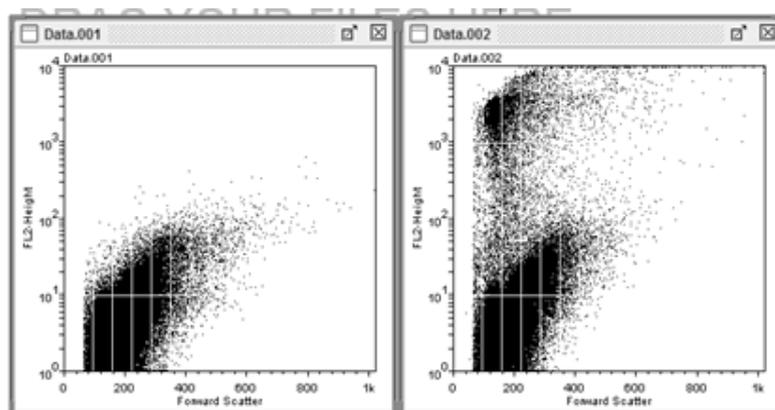


Рис. 2. Цитограммы спленцитов мыши после градиентного центрифугирования. На левой цитограмме отмечается уменьшение крупных и зернистых клеток, высокая однородность популяции. На правой цитограмме показан захват мертвыми клетками пропидия йодида, фиксируемого по FL2 каналу

При концентрировании клеточной суспензии в большинстве проб минимальная активность цитидиндезаминазы отмечается (табл.), в сравнении с исследованием плазмы тех же животных, где суммарный результат получается отрицательным: $-0,57$ МЕ/л.

Оптическая плотность (А) и значение активности цитидиндезаминазы в исследуемой группе

Исследуемая группа	Инкубация с опытным образцом, А	Инкубация с контролем реагентов, А	Удельный вес дезаминазной активности	Активность цитидиндезаминазы МЕ/л	Исходное содержание аммиака, А
1	0,659	0,693	-0,034	-0,99	0,548
2	0,58	0,537	0,043	1,26	0,492
3	0,246	0,244	0,002	0,06	0,137
4	0,268	0,231	0,037	1,08	0,124
5	0,342	0,272	0,070	2,04	0,138
6	0,323	0,234	0,089	2,60	0,111
7	0,376	0,216	0,160	4,67	0,122
8	0,341	0,254	0,087	2,54	0,132
9	0,346	0,258	0,088	2,57	0,123
10	0,271	0,231	0,040	1,17	0,141
Среднее значение активности, МЕ/л				1,70	

Методика колориметрического индофенольного измерения активности цитидиндезаминазы предполагает инкубацию образца с раствором нуклеозида. В конце инкубации добавляют фенольно-нитропруссидный раствор, который терминирует ферментативную активность — это опытная проба (табл.). Параллельно инкубируют просто раствор нуклеозида, куда исследуемый образец добавляют уже после фенольно-нитропруссидного раствора [2] — это контроль образца (табл.). Разность образца и контроля образца и должна дать долю аммиака, образовавшегося в результате ферментативной дезаминации в общем количестве образовавшегося индофенола. Аммиак в контроле образца (табл.) может появиться по следующим причинам: 1) исходный аммиак в самой пробе; 2) неферментативный распад цити-

дина в растворе; 3) денатурация образца при добавлении его в контроль после фенола.

Расчетное значение доверительного интервала для среднего значения активности фермента имеет значение $\pm 0,97$ МЕ/л, что, во всяком случае, позволяет судить о присутствии или отсутствии активности.

Значительный интерес представляет интерпретация отрицательных результатов разности исследуемого образца и контроля образца. Отрицательное значение разности говорит, во-первых, о незначительной активности самого фермента-дезаминазы; во-вторых — о течении индофенольной реакции, в-третьих — о возможной активности ферментов трансаминаз в образце, либо других причинах потери аммиака в растворе, как химической, так и физической природы. Само течение индофенольной реакции после окончания инкубации представляется наиболее управляемой величиной (рис. 3). Через 40 мин после добавления фенола-нитропруссида и гипохлорита натрия образование индофенола в растворе стандарта не повышается, то есть весь аммиак учтен. Растворы же субстратов начинают давать прирост аммиака за счёт взаимодействия нуклеозидов с фенольно-нитропруссидным раствором и гипохлоритом натрия (рис. 3).

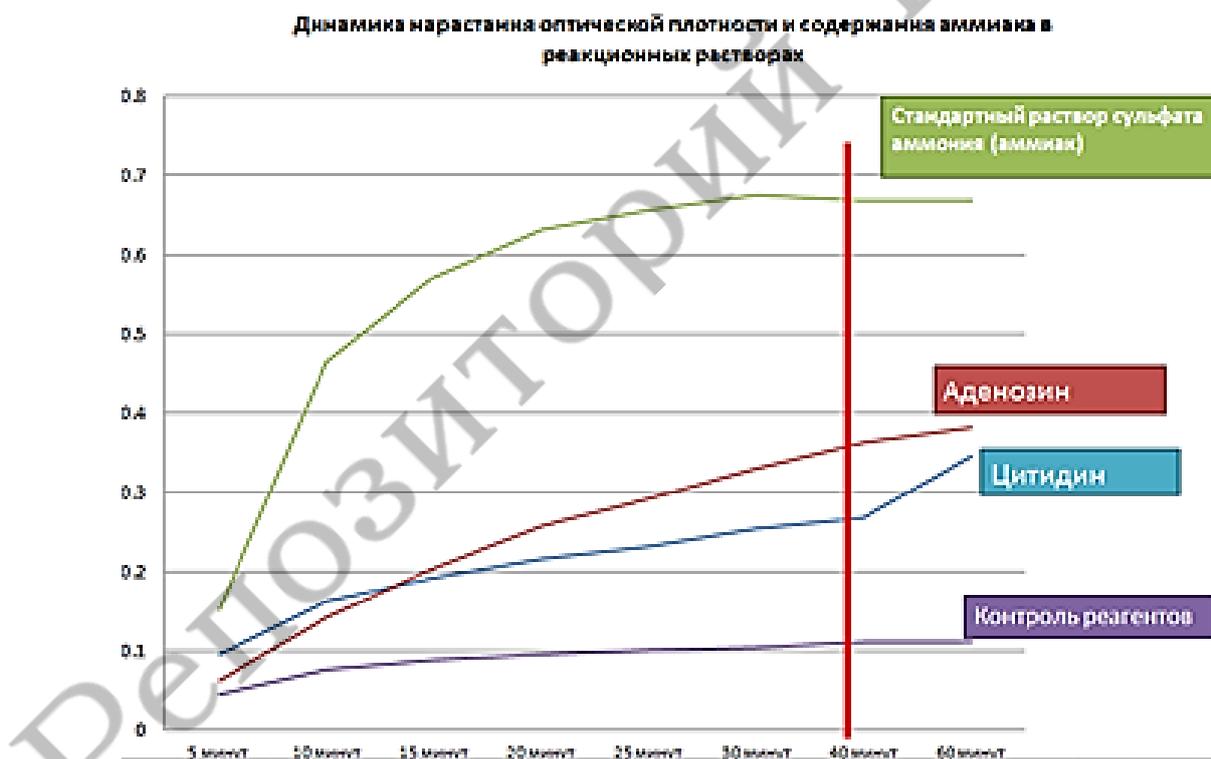


Рис. 3. Динамика нарастания оптической плотности и содержания аммиака в реакционных растворах

Активность цитидиндезаминазы постулируется рядом исследователей, как крайне чувствительный параметр. Так, в работах Р. W. Thompson и I. T. James [5], посвящённых исследованию сывороточных дезаминаз пациентов с разными формами заболеваний, отмечалось, что уровень дезаминации цитидина может быть крайне чувствительным ($\pm 1,1$ МЕ/л). Диагностически значимым для рака груди предлагалось

считать повышение активности фермента у пациенток с $4,96 \pm 2,34$ до $13,3 \pm 3,72$ МЕ/л. Однако анализ баз данных по ферментативной активности цитидиндезаминазы у широкой совокупности организмов как про-, так и эукариотических не даёт сведений о точных базальных величинах активности [8]. Параметр этот ни у *Mus musculus*, ни у *Homo sapiens* пока не стандартизирован, причём даже для плазмы, не говоря уже о *внутриклеточной* активности [8]. При очистке и концентрировании фермента исследователям не удавалось достичь «запредельных» величин активности: так G. W. Ashley, P. A. Bartlett после хроматографической очистки белков *Escherichia coli* и концентрировании в 1690 раз добились активности в 118 ед./мг. Т. Cacciapani с коллегами при выделении фермента из человеческой плаценты добились высокой степени концентрирования (46 000 раз), но финальная активность была не самой высокой (64,1 ед./мг) [8].

Таким образом, можно сделать вывод, что естественная внутриклеточная активность цитидиндезаминазы в норме, вне микробных, либо генетических триггеров, является величиной не значительной.

Выводы:

1. Базальное значение внутриклеточной активности цитидиндезаминазы у мышей C57BL/6 в среднем равно 1,7 МЕ/л.
2. Оптимальное время учёта реакции составляет 40 минут после терминации инкубации с исследуемым образцом.
3. Исходное содержание азота образца и активность ферментов трансаминаз способны значительно снизить измеряемое количество аммиака, полученного от дезаминации.
4. Естественная внутриклеточная активность цитидиндезаминазы в норме, вне микробных, либо генетических триггеров, является величиной не значительной.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Титов, Л. П.* Компьютерная иммунология : сравнительный анализ нуклеотидных замен в CDR и FR фрагментах в VH генах иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах / Л. П. Титов, Т. А. Столярова, Е. А. Столярова // Вести НАН РБ. Медицинская серия. 2010. № 3. С. 10–18.
2. *Янович, О. О.* Активность аденозиндезаминазы крови при инфекционном мононуклеозе / О. Янович, Л. П. Титов, В. В. Щерба // Здоровоохранение. 2012. № 12. С. 17–19.
3. *Способ* диагностики плеврита туберкулезной этиологии на основании определения активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови и в плевральной жидкости : инструкция Министерства здравоохранения Республики Беларусь, регистрационный № 015–0308 / А. Д. Таганович [и др.]. Минск, 2008.
4. *Gavin, D. P.* Active DNA demethylation in post-mitotic neurons : a reason for optimism / D. P. Gavin, K. A. Chase, R. P. Sharma // *Neuropharmacology*. 2013, Aug 16. doi:pii: S0028–3908 (Epub).
5. *Chowdhury, S.* Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus / S. Chowdhury // *FEBS Lett*. 2013, Aug 15. doi:pii: S0014–5793(13)00621–2 (Epub).
6. *Hogenbirk, M. A.* Differential Programming of B Cells in AID Deficient Mice / M. A. Hogenbirk // *PLoS One*. 2013, Jul 29; 8(7): e69815. doi: 10.1371 // *Journal. Pone*. 0069815. Print 2013.
7. *KEGG* : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Электронный ресурс]. Режим доступа : <http://www.genome.jp/kegg>. Дата доступа : 2.09.2013.

Актуальные проблемы микробиологии, вирусологии, иммунологии: материалы
научно-практической конференции
Минск, 19 октября 2018

8. *The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA* [Электронный ресурс]. Режим
доступа : <http://www.brenda-enzymes.org>. Дата доступа : 09.08.2013.

Репозиторий БГМУ